ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Année 1948 N° 52

L'EXAMEN HISTOLOGIQUE DES PATÉS

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

soutenue publiquement en 1948

DEVANT LA

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

PAR

PIERRE RANCIEN

Né le 6 Juillet 1922, à Couddes (Loir-et-Cher)

JURY { *Président :* M. ANDRIEU, professeur à la Faculté de Médecine
Assesseurs : MM. DARRASPEN, LOMBARD } Professeurs à l'Ecole Vétérinaire

TOULOUSE
IMPRIMERIE MODERNE
22, rue Sainte-Ursule, 22

1948

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

PERSONNEL ENSEIGNANT

MM.

Directeurs honoraires ..... CUILLÉ / MARTIN

Professeur honoraire ..... LECLAINCHE

Directeur ..... PONS

PROFESSEURS

Chimie et Pharmacie ..... N...

Anatomie ..... FLORENTIN

Physiologie ..... N...

Anatomie pathologique. - Inspection des viandes .. LOMBARD

Parasitologie ..... BRIZARD

Médecine ..... DARRASPEN

Chirurgie ..... LASSERRE

Pathologie du bétail ..... BERTHELON

Maladies Microbiennes ..... N...

Zootechnie ..... PONS

AGREGES

Anatomie ..... BENOIT

Médecine ..... FLORIO

Chirurgie ..... PUGET

Zootechnie ..... LADRAT

CHEFS DE TRAVAUX

Chimie et Pharmacie ..... GODFRAIN

Pathologie du Bétail ..... TOURNUT

ASSISTANTS

Parasitologie ..... CHEYROUX

COURS COMPLEMENTAIRES

Pisciculture et maladies des poissons ..... SECONDAT

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924).

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Année 1948 N° 52

L'EXAMEN HISTOLOGIQUE DES PATÉS

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

soutenue publiquement en 1948

DEVANT LA

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

PAR

PIERRE RANCIEN

Né le 6 Juillet 1922, à Couddes (Loir-et-Cher)

JURY { *Président :* M. ANDRIEU, professeur à la Faculté de Médecine
Assesseurs : MM. DARRASPEN, LOMBARD } Professeurs à l'Ecole Vétérinaire

TOULOUSE
IMPRIMERIE MODERNE
22, rue Sainte-Ursule, 22

1948

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MES PARENTS

Faible témoignage de ma profonde affection et de ma reconnaissance pour tous les sacrifices qu'ils se sont imposés pour mes études.

A TOUTE MA FAMILLE

A MES MAITRES

Hommages respectueux.

A MES AMIS

A MES CAMARADES

A Monsieur le Professeur ANDRIEU

Chevalier de la Légion d'honneur
de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie
de Toulouse

qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

A Monsieur le Professeur DARRASPEN

Chevalier de la Légion d'honneur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

qui par sa bienveillance et son grand savoir a su se faire aimer de tous ses étudiants.

A Monsieur le Professeur LOMBARD

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

En témoignage de notre sincère gratitude pour la bienveillance qu'il a montrée à notre égard.

A Monsieur le Colonel Vétérinaire SOULIE

En remerciement pour l'intérêt qu'il porte à ce travail.

A M. le Commandant Pharmacien DURAND

Pour l'aide qu'il nous a apportée.

A Monsieur le Capitaine Vétérinaire MERCIER

Pour l'amabilité avec laquelle il nous a ouvert son laboratoire et nous a aidé pour l'élaboration de ce travail.

AVANT-PROPOS

A la veille de sortir de cette école, c'est pour nous un grand plaisir de remercier Monsieur le Professeur LOMBARD *qui nous a fait le grand honneur de nous accepter dans san laboratoire durant toute notre scolarité.*

Nous ne saurons jamais oublier comme ce brillant Maître a su être paternel et combien il a sacrifié pour nous de ses précieux instants.

INTRODUCTION

Les pâtés ont, de tout temps, donné lieu à de nombreuses fraudes. Il était normal, en effet, que les charcutiers, après avoir manipulé, trituré, haché, fait cuire et recuire leur produit, pensent qu'il était impossible de retrouver quels avaient été les matériaux utilisés.

Ces dernières années de disette, en voyant s'élever le prix de revient de la viande, ont aussi vu fleurir le règne de la fraude. Dès le début le charcutier peu scrupuleux a compris ses possibilités !

La charcuterie de disette, disons d'ersatz, est même devenue légale. On a fabriqué durant la guerre des pâtés, peu nourrissants sans doute, mais suffisamment sapides pour être « ingérés » : pâtés d'abats, pâtés de poisson, galantine de poisson, pâtés d'abats de cheval, pâtés de tête de mouton, pâtés de déchets de cuirs même, pâté végétal. Tout était admis. Il fallait manger à tout prix.

Cependant la guerre est finie, mais l'habitude d'incorporer de bas morceaux s'est maintenue. Certains fabricants auraient tendance à penser qu'un pâté qui n'est pas vendu à un prix exorbitant peut contenir autre chose que du porc, même s'il est marqué pur porc, autre chose que du foie, même marqué pâté de foie. Les rillettes ne contenant ni muscle, ni graisse de bœuf sont très rares !

Or, nous sommes revenus en un temps où la viande n'est plus rare. Il est temps de mettre fin à ces pratiques. C'est, en effet, une fraude particulièrement grave, car ces produits sont non seulement de qualité inférieure mais ils sont vendus à des prix très onéreux, bien supérieurs à ceux d'une bonne denrée non manipulée.

Dans ce domaine, la législation française est en retard sur la législation allemande. Outre-Rhin, une saucisse de 15 Pfennig les 100 grammes doit contenir, légalement, un taux de foie parfaitement déterminé.

Les Allemands ont bien défini leurs produits, parce que les fraudes étaient très fréquentes et parce qu'ils savaient pouvoir les dépister par la méthode histologique.

En France, les fraudes par substitution d'organe étaient très rares avant cette dernière guerre, et les Français n'avaient pas de moyens pour faire respecter des règlements.

Seule, en France, l'armée pratique une inspection minutieuse de la charcuterie. L'analyse histologique

pourra lui rendre les mêmes services qu'elle a rendus aux experts militaires allemands. F. SCHONBERG a montré, en effet, dans un article du 5 avril 1940, publié dans le Berliner und Müncher Tierärztliche Wochenschrift tout le parti qu'un inspecteur militaire pouvait tirer de cette méthode.

Nous nous limiterons, dans ce travail, à l'examen histologique des seuls pâtés et rillettes, parmi les produits de charcuterie.

Les pâtés sont, d'après *l'art.* 10 *du décret du* 15 *avril* 1912, des préparations contenant des viandes, abats ou issues, uniquement de porc, de bœuf, de veau ou de mouton. Cette définition légale peut aussi s'appliquer aux rillettes.

Parmi les pâtés, il faut, en gros, distinguer quatre catégories :

1° *Pâtés d'abats* : contenant foie, rein, intestin, langue, estomac, parties charnues de la tête. Ces pâtés ne doivent renfermer ni mamelle, ni rate, ni poumon, ni vessie, ni organes génitaux. La quantité d'intestin ne doit pas être trop grande, car cet organe est peu digestible et peu nourrissant. Ces organes sont finement hachés et bien malaxés. On additionne le produit haché d'environ la moitié de son poids de graisse si les produits sont maigres. On peut en mettre beaucoup moins si les organes utilisés sont très gras. Le tout est cuit à petit feu convenablement épicé.

2° *Pâtés de viande :* ces pâtés sont très voisins des rillettes. Ils n'en diffèrent que par la méthode de préparation. Ils sont identiques dans leur composition. On hache finement le muscle, débarrassé de toute aponévrose et de tout tendon. On ajoute plus ou moins de graisse suivant la qualité du muscle. Le tout est mis à cuire à feu doux et épicé. Du tendon finement haché est admis comme liant.

3° *Pâtés en croûte :* Ce sont les premiers qui furent imaginés. Jusqu'au siècle dernier, lorsque l'on parle de pâtés, il s'agit de pâtés en croûte.

C'est un pâté de viande, enrobé et cuit dans une pâte feuilletée. Ce met est particulièrement succulent quand il est servi chaud.

4° *Pâtés mixtes :* contenant muscle et abats.

L'armée, dans sa circulaire n° 1994, dans son article III, définit un pâté de viande de bœuf et foie de porc.

Il contient, en kilog pour cent de matière mise en œuvre :

Viande de bœuf parée, dégraissée	40
Foie de porc	10
Gras de porc	20
Couenne de porc	15
Gelée de tendon	10
Fécule	3

Sel 2
Aromates (poivre broyé, salpêtre, sucre etc).. ..... Q.S.

(Il faut souligner que, seule, la gelée de tendon entre dans ce pâté, le tendon lui-même n'est pas admis).

Les Rillettes sont aussi parfaitement définies dans cette circulaire et leur fabrication sera conduite suivant les prescriptions suivantes :

a) viande employée :

Les viandes provenant du désossage des quartiers de bœuf, exception faite des parties grasses, tendineuses et aponévrotiques, sont découpées en morceaux ou lanières de 500 à 750 grammes.

b) broyage :

Les morceaux ou lanières sont passés au broyeur à grilles (plaque diamètre 130 mm - 10 trous) de façon à obtenir des morceaux de la grosseur d'une noix.

c) cuisson :

La durée de cuisson sera de 5 h. après ébullition de la masse. La viande devra, en principe, être cuite dans la matière grasse et non dans l'eau.

d) Assaisonnement :

2 kg. de sel pour 100 kg. de viande.
épices = Q. S.

e) Incorporation de matières grasses :

Le saindoux ou le gras cuit de porc est incorporé au mélange en procédant de telle sorte que les corps gras soient absorbés par le brassage. Ce brassage se fait au moyen d'un mélangeur mécanique, et doit produire un ensemble parfaitement homogène, de manière que le gras ne se sépare pas de la viande et soit uniformément réparti dans celle-ci.

On est évidemment loin de la rillette vendue dans nos campagnes de Touraine, constituée uniquement par de la viande de porc que l'on a fait, à chaud « fondre », comme disent les paysans, dans du saindoux. En ajoutant du foie de porc, on obtient cette succulente rillette de Blois. Aux environs de Chartres, la rillette, faite avec du lapin, du veau et du porc, est onctueuse et l'on comprend que les paysans qui en mangent, chaque matin, à leur petit déjeuner, ne s'en lassent jamais.

On le voit, la loi ne définit les pâtés que d'une façon évasive. Il serait à souhaiter que des textes précisent exactement la composition des produits afin que nous sachions, à côté de la fraude présentement légale, où commence et où finit celle qui ne l'est pas. A côté de l'addition d'eau, de produits inalibiles ou dangereux devraient entrer en ligne de compte les produits peu ou pas assimilables.

Nous examinerons d'abord les techniques usuelles employées dans la plupart des laboratoires pour dépister les fraudes. Puis nous examinerons la technique de

l'examen histologique : ce qui a trait à la préparation des coupes et à leur interprétation.

Nous nous étendrons particulièrement sur les différentes méthodes d'inclusion, car c'est là le temps le plus délicat.

Nous montrerons les limites de la méthode, et nous conclurons en soulignant tous les avantages pratiques et l'intérêt qu'il y aurait à la généraliser.

CHAPITRE PREMIER

LES DIVERSES TECHNIQUES DE RECHERCHES DES FRAUDES

Les laboratoires du Service de Répression des Fraudes ne se sont jamais beaucoup intéressés aux produits manipulés de charcuterie. La ville de Paris, seule en France, a un service organisé à cet effet.

Parfois *l'examen macroscopique* suffit pour voir si un pâté est riche en eau, par exemple, ou en tissus fibreux. Il nous a été permis de voir un pâté, examiné au laboratoire (n° 31) qui, après avoir été trituré, afin de le rendre homogène pour en effectuer l'analyse chimique, était déliquescent, et coulait comme une pâte molle, sans onctuosité. Il contenait une grande proportion d'eau.

L'examen chimique donne de grandes précisions. C'est celui auquel on a le plus souvent recours pour

dépister les fraudes avec certitude. En effet, il est naturel que la précision des nombres ait une grande valeur devant un tribunal.

L'appréciation des fraudes, par cette méthode, est basée sur l'analyse de produits commerciaux authentiques, c'est-à-dire de produits types. En dessous ou en dessus d'une certaine marge, la fraude est certaine.

L'expertise chimique comporte le dosage de l'humidité, des albuminoïdes, des graisses, des hydrates de carbone, des substances minérales (séparément les chlorures) et la recherche des matières anormales : antiseptiques, principes colorants. Il est pris comme base de comparaison, pour l'humidité, la quantité d'eau contenue dans le produit supposé dégraissé.

Les fraudes le plus couramment rencontrées sont celles consistant dans l'addition d'une forte proportion d'amidon, seule ou avec adjonction d'eau. L'addition d'eau, pendant la cuisson, donne, avec l'amidon, un empois d'amidon et ainsi ne diminue pas la consistance du produit. On observait aussi jadis l'addition d'une trop grande quantité de graisse, particulièrement dans les rillettes. Mais cette fraude n'est plus rentable, vu le prix actuel de la graisse.

Il est courant aussi d'avoir du pâté étiqueté « pur porc » et qui contient du bœuf. Pour dépister cette fraude, on a essayé de doser le glycogène contenu dans le muscle, mais la *méthode biologique* de séro-précipitation, basée sur l'emploi de sérum de lapins sensibilisés à différentes espèces, demeure la méthode de choix.

La *méthode physique* de polarimétrie a été utilisée, concuremment avec la méthode d'analyse chimique, pour savoir si un pâté de foie contenait vraiment du foie. En effet, l'acide cholalique ne se trouve que dans cet organe et ses bandes d'absortion sont parfaitement définies.

La densité : Nous avons remarqué qu'un pâté contenant une forte proportion de poumon ou de graisse voit sa densité diminuer. Les pâtés qui nous sont présentés sont rarement très gras. Ces derniers sont d'ailleurs faciles à reconnaître à leur aspect et à leur onctuosité. On peut donc conclure qu'un pâté ayant une densité égale ou à peine supérieure à celle de l'eau doit être suspecté de contenir du poumon. Il ne s'agit d'ailleurs là que d'une simple présomption.

Examen organoleptique :

Le goût, parfois fort subtil, diagnostique la présence de tel ou tel élément. Ainsi, les gourmets diagnostiquent-ils dans les rillettes du Mans, la chair d'oie, dans les rillettes de Blois, le foie de porc et, pourtant, l'un et l'autre en petite quantité.

Mais « l'empire de la saveur a aussi ses aveugles et ses sourds », et l'on voit mal les dignes juges d'un tribunal rendant leurs arrêts « le cou allongé et le nez à babord », comme BRILLAT-SAVARIN décrit ses invités.

L'examen organoleptique comprend aussi celui de

la couleur qui ne donne que peu de renseignements précis car la cuisson la fait varier largement.

L'odeur renseigne sur l'état de conservation du produit. Cet examen a beaucoup de valeur, mais, malheureusement, il n'y a pas plus d'unité et de définition des odeurs que des saveurs et, pour bien définir sa pensée, il faut des faits tangibles. Peut-être percevra-t-on au goût la sensation du tendon ou d'aliment putréfié. Mais l'arrêt sera toujours discutable et il sera facile de tromper le dégustateur en additionnant le produit d'une forte proportion de condiments de toutes sortes. Et pourtant, la dégustation est, pendant longtemps, restée le seul moyen pour savoir ce qui avait servi à la fabrication d'un pâté.

Méthode bactériologique :

Pour savoir l'état de conservation du produit, l'examen bactériologique est, de beaucoup, le plus sûr. Dans l'armée, il est effectué uniquement par des vétérinaires spécialement qualifiés. Ils pratiquent, d'une part, un examen direct sur frotis du pâté et, d'autre part, un examen après ensemencement.

a) Si l'examen direct révèle une grande quantité de germes et que la culture ne pousse pas ou ne contienne que des germes banaux, on peut affirmer que le pâté a été fabriqué à partir de viandes altérées qui ont été stérilisées par la cuisson, ce qui est une fraude grave et malheureusement fort courante. Les produits qui

n'avaient plus aucune valeur à l'état frais sont ainsi écoulés à des prix très rémunérateurs pour le commerçant. On ne saurait être trop sévère dans cette circonstance car les toxines thermostables ne sont pas détruites et peuvent provoquer des accidents d'anaphylaxie, sinon des empoisonnements.

b) Si la culture pousse, c'est là le signe d'une altération et non pas d'une fraude, mais la saisie s'impose aussi.

La méthode bactériologique, très précise, permet de suppléer au manque de précision de notre odorat.

La *méthode histologique* est venue combler la lacune essentielle laissée par l'appréciation personnelle des caractères organoleptiques, apportant à la technique la précision qui manquait.

Au début, on se bornait à un *examen anatomique* après dilacération dans l'eau au voisinage de 50°. On avait remarqué que les diverses manipulations, lavages, brossages, raclages, broyage, cuisson conservent aux tissus sinon leur aspect primitif, du moins suffisamment de caractères, pour qu'il soit possible de les reconnaître.

PIETTRE dit : « Quant aux organes employés entiers ou en fractions même petites, la texture des tissus qui les constituent permet de les retrouver et de les identifier, non seulement dans la même espèce animale, mais même pour des espèces différentes. »

JODBILLE a appliqué avec succès la méthode anatomique à l'inspection des andouilles, et nous résumons

ici les conclusions pratiques auxquelles il a abouti en ce qui concerne les substitutions d'organes : La caillette de mouton, parfois utilisée seule, offre à la coupe un aspect plissé qui simule celui produit par le gros côlon du porc. On la reconnaîtra cependant à la coloration du tissu blanc sous-muqueux, qui, au lieu d'être blanc nacré comme chez le porc ou le veau, possède une teinte gris perle.

La panse de mouton se distingue de celle du veau de lait surtout par la forme des papilles qui sont allongées, foliacées, à épiderme corné épais, tandis que chez le veau, elles sont petites, coniques, en raison de leur développement incomplet.

Le réseau, chez le veau, a ses alvéoles divisés par deux cloisons interalvéolaires moins élevées que les lames qui délimitent chaque alvéole. Chez le mouton, les alvéoles sont plus grands, les cloisons existent à peine, le fond de l'alvéole est simplement granité par des papilles d'aspect miliaire.

Les andouilles préparées avec des matrices de truie sont faciles à reconnaître. Sur la coupe, les fragments de cornes d'utérus, fendus en partie pour le nettoyage, se montrent sous la forme de croissant ; ils prennent la forme d'un cercle s'il s'agit des extrémités des cornes non fendues.

La matrice de vache n'est guère utilisée dans la préparation des andouilles, à cause de sa coloration jaunâtre ; elle est plus fréquemment employée en menus fragments dans la fabrication des andouillettes. On la

reconnaîtra à sa couleur et à l'aspect des vaisseaux flexueux et béants répartis entre les deux tuniques musculaires ; on peut rencontrer aussi des papilles, vestiges de cotylédons...

Les andouilles faites avec l'estomac de cheval se reconnaissent à leur coloration jaune sale, à la faible cohésion entre les différents fragments due à la fluidité de la graisse de cheval, à la différence des muqueuses (œsophagienne et stomacale). aux caractères de la graisse, jaune, très fusible.

Les andouillettes de qualité inférieure sont souvent fabriquées avec du gros intestin de cheval ; on les reconnaîtra à leur coloration jaunâtre et à leur facile désagrégation.

La présence d'œsophage est indiquée par les plissements de la muqueuse et ses caractères bien connus.

L'examen anatomique, on le conçoit, ne donne des précisions suffisantes que lorsque les fragments sont ni trop petits, ni trop manipulés. Aussi, a-t-on essayé de perfectionner la méthode en réalisant l'examen à la loupe binoculaire. Mais là encore, le champ d'action était limité. Aussi devait-on logiquement arriver au microscope.

CHAPITRE II

METHODE HISTOLOGIQUE

La méthode histologique consiste dans la préparation et l'examen de coupes, pratiquées à partir des pâtés, dans le but de déterminer leur composition anatomique, en se servant de connaissances d'histologie normale et pathologique.

§ I. — Historique

En France, c'est le Docteur Gophille, du Service Vétérinaire de la Seine qui, en 1912, eut le premier l'idée d'un examen des fragments. Il utilisait couramment soit l'observation à la loupe, soit l'examen au faible grossissement, de prélèvements écrasés dans le compresseur à trichinoscopie. Cet examen est, plutôt qu'un examen histologique, un examen anatomique.

M. Poisson, sous-chef de secteur au service sanitaire de la Seine, publie en mars 1943 : « Recherches sur la composition anatomique des produits manipulés de la charcuterie. Technique histologique ». Il écrit dans son introduction : « En France, il n'existe pas, à notre connaissance, de travaux sur ce sujet ».

M. le Professeur Drieux, en 1945, publie un article : « Examen histologique des produits manipulés de la charcuterie ».

F. Lucam et E. Mathieu remarquent la persistance de la structure microscopique du muscle dans les produits de la charcuterie.

Si la liste d'auteurs français est courte et si l'étude de ce procédé n'a pas été très poussée en France, par contre, en Allemagne, tous les laboratoires pratiquent cette méthode.

Nous ne nommerons ici que les principaux auteurs: le Professeur Schonberg, Mayer, Glamser, Gregor, Frickinger, Breusch, Escher, Lund, Schroder, Renner, Rohrer, Brekenfeld, Clausen, Junack, Kalbert, Neumuller, Seel, Reihling, Zeeb, Spiegel, plus récemment Beller, Bodrossy, Dutschke, Kammel, Niemeyer, Rievel, Paarmann, Wesselinof, Endress. Deux thèses ont été soutenues sur ce sujet à Hanovre : celle de Hartmann en 1940 et celle de Raue en 1942.

La méthode a eu aussi ses détracteurs comme W. SCHMIDT (1941) qui nie la valeur de cet examen histologique.

Il cite le cas d'un même échantillon de saucisse examiné dans quatre instituts différents, qui ont donné des réponses discordantes.

SCHONBERG souligne l'intérêt de la méthode : cet examen est le seul permettant de reconnaître l'addition de tissus étrangers à la composition annoncée par le fabricant.

ZIEGLER, qui a pratiqué plus de 4.000 examens, de 1936 à 1940, confirme l'opinion de SCHONBERG et réfute celle de SCHMIDT. Il est d'ailleurs à remarquer que devant cette levée de boucliers SCHMIDT n'a pas insisté.

En Allemagne, la méthode fut mise en pratique déjà après la guerre 1914-1918. SEEL et REIHLING publient des articles sur ce sujet dès 1918. Depuis 1920, la méthode revient en grand honneur. De 1940 à 1944, elle est pratiquée par toute l'Allemagne.

Ces quelques dates sont fort éloquentes. On peut remarquer, en effet, que les services publics allemands se sont intéressés à cette méthode au moment des disettes. On en déduira que, dès 1934, l'Allemagne commençait à manquer de denrées alimentaires.

Les Allemands s'y sont intéressés pour deux raisons principales :

— tout d'abord, comme en France, parce que la raréfaction des denrées alimentaires, provoquant une hausse des prix, incite le fabricant malhonnête à mettre des éléments inalibiles dans ses produits manipulés. Cette fraude a beaucoup plus d'importance en Allemagne qu'en France car il est vendu beaucoup plus de charcuterie dans ce pays que chez nous,encore qu'en France la vie moderne ait augmenté dans une grande proportion la consommation de la charcuterie.

— La deuxième grande raison tient surtout à la fréquence des fraudes. Aussi l'Allemagne a-t-elle une législation fournie règlementant la charcuterie. Cette législation s'applique surtout à la composition des nombreuses variétés de saucisses, variable suivant les prix.

Cette législation s'appliquant surtout aux saucisses, les études faites en Allemagne visent plus particulièrement l'examen de ces produits. Les techniques allemandes doivent donc être modifiées pour s'appliquer aux pâtés, produits plus souvent consommés en France.

§ II. — Techniques

Nous examinerons successivement les techniques préconisées en Allemagne, en France, puis la technique que nous avons essayé de mettre au point, sur le conseil et sous les directives de notre Maître, M. le Professeur Lombard, en nous efforçant de simplifier les manipulations, tout en leur gardant la précision désirable.

Il faut remarquer que *la fixation,* qui est indispensable dans la méthode d'histologie des tissus crus, n'est pas nécessaire ici, puisque les pâtés et les rillettes ont suffisamment été fixés par la cuisson. Il n'y a que dans le cas où la recherche doit porter sur des hachis crus, que la fixation devient indispensable. On fixe en laissant le produit 24 heures dans une solution de formol à 7 %. Les Allemands conseillent de mettre le produit 30 minutes, à 40 degrés, dans une solution au quart. On peut aussi employer le liquide de Bouin, de Müller, de Tellyesnisky.

Les méthodes divergeant particulièrement quant à l'inclusion, comparons d'abord les techniques employées dans ce premier temps. Puis nous examinerons la fabrication des coupes et leur coloration.

I. — De l'inclusion.

Les techniques d'inclusion mises en œuvre sont, en gros, de trois sortes : inclusion à la gélatine, à la gélose-paraffine, à la paraffine.

A) Méthode a la gélatine

Elle fut préconisée par Gaskell-Graff et a été améliorée par divers auteurs : Brekenfeld, Breusch, Escher, Glamser.

Cette méthode qui a rendu de grands services dans l'examen des dépôts de cholestérine dans les plexus des ventricules latéraux ,est utilisée avec succès quand il

s'agit de tissus mous (poumon, plexus) ou quand les tissus et les substances lipoïdes ne peuvent supporter les alcools forts.

Comme masse d'inclusion, on emploie une solution épaisse et une solution plus fluide de gélatine.

La solution épaisse se compose d'une partie de gélatine et de trois parties d'eau phéniquée à 1 %.

La solution plus fluide comprend une partie de la solution épaisse et une partie d'eau phénique à 1 %.

GLAMSER décrit ainsi, pour les saucisses, la technique du procédé :

1. Fixation d'une tranche de saucisse de 3 millimètres d'épaisseur dans le formol à 10 %.
2. Mise en eau pendant 24 heures.
3. 3 à 24 h. dans la solution de gélatine la plus fluide.
4. 3 à 24 h. dans la solution de gélatine la plus épaisse.
5. Inclusion dans la solution de gélatine épaisse et laisser solidifier autant que possible 30 minutes dans la glacière.
6. Laisser sécher à l'air, jusqu'à ce que la consistance d'une gomme à effacer à moitié dure soit atteinte.
7. Durcissement du bloc dans une solution de formol.
8. Déshydrater.
9. Couper au microtome.

BREUSCH nous dit les modifications apportées à la méthode.

L'ébullition rapide avec du formol à 10 % peut être pratiquée lorsque le liant est suffisant. Mais pour les saucisses de foie, pour la viande hachée, les ragouts, les salades de viande, il faut le durcissement à froid par la solution de formol.

BREUSCH reproche à cette méthode d'être trop longue. En effet, SEEL et MAYER préconisent au moins 2 à 3 jours, GLAMSER et FRIKINGER 5 à 7 jours, et BREUSCH dit que, par expérience, il a constaté qu'il fallait parfois 8 à 10 jours pour avoir des blocs parfaits et qu'il soit possible de couper. Il faut remarquer que la pénétration du produit à inclure par les substances d'inclusion est influencée grandement par la teneur en matières grasses. Cette graisse rend parfois impossible l'examen histologique par cette méthode car les coupes tombent en fines particules au passage du rasoir.

Ces inconvénients apparaissent surtout désagréables lorsqu'il s'agit de liquider rapidement un cas litigieux et lorsque des mesures doivent être prises instantanément. Lorsqu'une confiscation est envisagée ou lorsqu'une marchandise consignée doit être libérée, une technique différente s'impose.

BREUSCH, qui a particulièrement travaillé cette méthode, a tenu à la simplifier et à l'accélérer pour la rendre plus accessible et plus pratique.

Sa méthode considérablement plus courte devra être employée pour les conglomérats mal liés ou non liés. Cet auteur enlève la graisse, d'où l'inutilité de sa détection au microscope. D'autre part, il renonce au durcissement par le formol qui demandait beaucoup de temps. La graisse est séparée par chauffage et la matière à examiner est délitée en ses différents constituants. Puis, la masse est reconstruite par inclusion dans la gélatine.

La méthode proposée est la suivante :

On prend un échantillon de 10-15 grammes. Il est recommandé de prélever, dès le début, plusieurs échantillons.

Ces 15 grammes sont mis dans une cornue d'Erlenmayer avec une solution de sérum physiologique. Chauffer dans ce bain à 80-90° jusqu'à ce que la masse se décompose en ses éléments et soit complètement en suspension dans le liquide. La graisse et d'assez grosses particules de tissus adipeux flottent à la surface. On enlève ces particules en décantant. Il suffit d'ajouter du sérum physiologique chaud et de faire déborder en prêtant attention que les particules de tissus qui flottent en dessous de la graisse ne s'écoulent pas. Les gros morceaux de tissus adipeux sont retirés à la pince.

Le contenu de la cornue est versé sur un crible. Le résidu est débarrassé du sérum physiologique restant en exprimant légèrement.

On met le résidu dans une coupe large de 3 cm., haute de 5 cm. On arrose de gélatine liquide à 20 %. On mélange avec précaution mais à fond. Le verre est

tenu pendant 10 à 15 minutes dans un bain-marie à 60-80°, tout en mélangeant à plusieurs reprises le contenu. Celui-ci est finalement versé dans un tamis en fil de laiton, tamis spécialement construit par BREUSCH et fabriqué industriellement en Allemagne. Il ressemble un peu aux petits récipients en toile métallique que nous utilisons dans les étuves à 56° pour mettre les tissus dans la paraffine. Les tamis en fil de laiton de BREUSCH sont parallélipipédiques, avec un côté mobile ,et livrés avec une sorte d'agitateur spécial qui permet d'enfoncer les particules. De cette façon, la gélatine superflue s'écoule et une composition égale et compacte du bloc est obtenue. Pour que les particules soient agglomérées, il suffit qu'elles soient entourées d'une toute petite quantité de gélatine. Mais l'élimination de la masse d'inclusion ne doit pas être poussée trop loin, sans quoi le bloc pourrait se casser. Le durcissement du bloc se fera de préférence à la glacière. Le côté mobile est enlevé, le bloc est sorti au couteau et mis dans le formol à 10 %. Ce durcissement ne demande que peu de temps, environ un quart d'heure. On obtient de meilleurs résultats si on laisse le formol pendant une ou deux heures. BREUSCH dit que le durcissement peut aussi se pratiquer après avoir fait la coupe, en mettant celle-ci dans l'alcool à 86°. Les coupes auraient une consistance suffisante pour ne pas se ratatiner. Après le durcissement, les coupes sont portées dans de l'eau distillée et, immédiatement après, colorées. Le coupage peut ainsi être entrepris après environ 45 minutes.

SCHONBERG, lui, nous expose l'excellence de la méthode de ESCHER et la complète. Il convient, d'ailleurs, que la méthode d'inclusion en masse est très bonne lorsqu'on veut préciser la situation des différents éléments histologiques.

La technique de ESCHER est la méthode officielle d'inspection histologique, en Allemagne. Elle, mérite donc d'être exposée, avec les modifications que SCHONBERG lui a apportées.

Cent grammes environ sont pris dans les différentes parties de l'échantillon. Ils sont mis sur du papier buvard ou sur un plateau de verre propre et déposés en un bloc, en ayant soin de ne pas déliter les particules. La masse est ensuite mise dans une cornue d'Erlenmayer à large col. On ajoute de l'éther pour dégraisser. Si l'on a affaire à un produit riche en graisse, l'éther est renouvelé plusieurs fois. Après avoir dégraissé, l'éther est soigneusement vidé sous la hotte ou à la fenêtre ouverte. Le produit est enserré, entre deux feuilles de papier buvard, en une couche mince pour que l'éther s'évapore facilement et complètement. Les éprouvettes employées alors sont de trois types :

1) soit une éprouvette en celluloïd,

2) soit une éprouvette en verre, type A ;

3) soit l'éprouvette de Dutschke qui est une éprouvette en verre d'égal diamètre, fermée à une extrémité par un bouchon de caoutchouc, l'autre extréminé restant libre. La sortie de la colonne de gélatine s'effectue

alors avec un fouloir, formant piston et qui chasse ainsi le produit hors du moule.

Après avoir évaporé l'éther, le produit à examiner est mis dans l'une de ces trois éprouvettes et on l'additionne de gélatine phéniquée chaude, à 20 % ou mieux, à 25 %. On tient au chaud les éprouvettes dans un bain-marie. On centrifuge alors pendant 10 minutes à raison de 3.000 tours à la minute. On fait solidifier la colonne de gélatine à la glacière ou dans l'eau froide. On enlève l'éprouvette qui a servi de moule. Dans cette méthode ,la colonne de gélatine est mise pendant 12 à 24 heures dans une solution de formol ainsi composée :

une partie de formol du commerce ;
quatre parties d'eau.

Avant de couper, il est recommandé de passer à l'eau pendant au moins 10 heures. La coupe au microtome devra se faire suivant le sens de la longueur du bloc de gélatine obtenu.

Cette utilisation de la centrifugeuse permettrait d'espérer que les tissus seraient groupés sur la coupe suivant l'organe auquel ils appartenaient. Il n'en est rien. Ils se groupent suivant leur masse. Les différents techniciens allemands ont beaucoup disçuté pour savoir s'il fallait ou non centrifuer, La question n'est pas vraiement résolue ; ce n'est d'ailleurs qu'une question de détail.

B) La méthode mixte a la gélose-paraffine

Préconisée par M. Poisson. Cet auteur précise dès le début de sa technique : « lorsque les fragments sont assez volumineux... hacher plus finement une certaine quantité du produit ». Puis ces fragments sont cimentés entre eux. Pour ce faire, il fallait trouver une substance solide, perméable au divers liquides intermédiaires (alcool, toluène), à la paraffine, et ne se teignant que légèrement par les colorants (la gélatine, en effet, se colore trop et donne ainsi des préparations peu lisibles). A cet effet, Poisson utilise les principes de la technique mise au point par Chatton pour l'inclusion à la paraffine d'objets très petits.

Voici le détail des opérations :

1° *Prélèvement :*

Sur le produit à examiner, en des points éloignés l'un de l'autre, on effectue trois prélèvements d'un poids total de 20 grammes environ. Placer les morceaux dans une fiole d'Erlenmeyer de 300 cc. que l'on remplit d'eau chaude à 80-90° centigrade. Briser la cohésion du produit à l'aide d'une baguette de verre. Les fragments se séparent et les graisses surnagent. Laisser reposer quelques minutes, puis décanter le liquide sur un tamis métallique à mailles de 1 mm. Répéter l'opération 3 ou 4 fois. Recueillir les débris restant dans la fiole et sur le tamis et les placer sur un petit carré de mousseline. Rabattre les angles et tordre de façon à exprimer le plus de liquide possible.

2° *Formation des blocs :*

Sur un verre de montre assez large (POISSON utilise un verre de 9 cm. de diamètre), étendre, à l'aide d'une aiguille à dissection, environ 5 grammes du produit. Verser sur le tout 7 à 10 cc. de gélose liquéfiée au bain-marie. Bien mélanger, puis, avec un scalpel et avant refroidissement de la masse, rassembler les fragments au centre du verre. On obtient ainsi un disque de 7 cm. de diamètre environ et d'un demi-centimètre d'épaisseur au centre. Après refroidissement, on détache aisément le gâteau ainsi formé en décolant ses bords avec un scalpel. A l'aide d'un rasoir, découper dans le centre deux blocs rectangulaires de 2 cm. sur 1 cm. 5. POISSON utilise une solution de gélose à 15 pour mille additionnée de 2,5 pour cent de formol, pour la conservation. La gélose ainsi préparée est conservée dans des tubes à essai bouchés au coton.

3° *Inclusion à la paraffine :*

POISSON emploie la technique suivante :

La déshydratation demande trois bains d'alcool en 24 heures : le premier dans l'alcool à 95°, les deux autres dans l'alcool absolu. Elle est suivie de deux bains de toluène en huit heures et trois bains de paraffine en dix-huit heures.

Remarque. — Au cours des opérations, il faut éviter de laisser sur le tamis métallique et dans les bains successifs, des fragment du produit à examiner. Des recherches ultérieures, portant sur d'autres produits pour-

raient ainsi être faussées. Après usage, il faut porter au rouge le tami métallique, sur le bec Bunsen, et filtrer l'alcool et le toluène conservés pour une autre recherche. Les bains de paraffine seront également filtrés.

C) Méthode d'inclusion a la paraffine

Cette méthode est celle employée en histologie. La méthode par congélation n'a pu la détrôner car elle offre le gros avantage de permettre des coupes d'une finesse extrême et d'une grande facilité de lecture. La paraffine pénètre jusque dans l'intimité des éléments cellulaires les plus délicats.

Cette inclusion comprend quatre temps :

— Déshydratation par les alcools.
— Imprégnation par un dissolvant de la paraffine.
— Imprégnation par la paraffine.
— Inclusion définitive.

1. - *Déshydratation :*

Le prélèvement à examiner après fixation ou sans fixation s'il s'agit de tissus cuits, est porté dans l'alcool à 90-95°, puis dans l'alcool absolu. Les bains successifs dans les alcools de concentrations croissantes sont absolument superflus ; on aura avantage à supprimer ce reliquat des anciennes techniques sans avoir à craindre aucun dommage pour les tissus. Les pièces à examiner sont passées deux ou trois fois dans l'alcool à 95°, puis mises dans l'alcool absolu. Le matériel conservé dans

l'alcool à 70° ou 90° peut passer directement dans l'alcool absolu.

Vases à employer : Les récipients les plus commodes et les plus économiques, pour toutes les opérations que doivent subir les pièces à inclure, sont les petits tubes bas à fond plat et bouchés au liège fin qui servent pour les collections. Les deux dimensions les plus pratiques sont 7 centimètres de hauteur sur 23 millimètres et 18 millimètres de diamètre intérieur.

Quantité d'alcool : Il n'est pas nécessaire d'employer une grande quantité d'alcool : il suffit que le liquide dépasse les pièces de un centimètre environ. Pour que l'alcool ne se sature pas d'eau, étant donnée la petite quantité de liquide déshydratant, il sera nécessaire de changer souvent le bain.

Pour changer les pièces, il est préférable d'opérer par décantation de manière à détériorer les pièces le moins possible. Eviter l'emploi des pinces, surtout pour les organes délicats. Pour empêcher les objets de tomber du tube pendant la décantation, obturer partiellement l'orifice avec le bouchon.

Durée de la déshydratation. — Elle varie suivant le volume des pièces. Il nous a été permis de remarquer qu'un volume donné de pâté se déshydrate plus vite qu'un même volume de tissu homogène, les liquides pénétrant facilement dans les interstices compris entre les différents fragments.

D'après LANGERON, vingt à trente minutes suffisent pour chaque bain. Avec deux bains d'alcool à 90° et trois bains d'alcool absolu, la déshydratation durera en moyenne deux heures et demie à trois heures.

On reconnaît qu'une pièce est déshydratée en versant du xylol dans le tube, après avoir bien égouté le dernier alcool absolu. Si le xylol reste limpide, a déshydratation est bonne. Si le moindre louche apparaît, il faut effectuer un nouveau passage par l'alcool absolu. Il ne faut pas craindre de prolonger la déshydratation car le séjour dans l'alcool absolu ne produit ni altération, ni durcissement et *une déshydratation insuffisante est beaucoup plus nuisible* pour les pièces.

Déshydratation par d'autres alcools. — La difficulté de se procurer de l'alcool éthylique absolu et la cherté de ce produit ont incité les travailleurs à essayer l'action déshydratante d'autres alcools.

L'alcool méthylique peut très bien être employé à la place de l'alcool éthylique. Il est bien moins coûteux. Il en est de même de l'alcool amylique qui a été préconisé par HOLLANDE. Ce corps est très peu volatil (il bout à 137°) et n'est pas hygroscopique. Il peut donc rester au contact de l'air sans en absorber la vapeur d'eau et sans troubler ensuite le xylol. Il est miscible avec l'alcool à 90° et le xylol, mais non avec l'eau qu'il ne dissout qu'en petite quantité. Il ne faut donc y plonger que des objets déjà en grande partie déshydratés par l'alcool à 90-95°. L'alcool amylique peut être éliminé soit par le toluène, à la manière habituelle, soit par l'huile de vase-

ine. Dans ce cas, après un séjour de 24 heures dans l'alcool amylique, on transporte la pièce dans de l'huile de vaseline renouvelée deux ou trois fois pendant vingt-quatre à quarante-huit heures,, puis dans la paraffine.

C. PEETERS utilise la propriété que possède l'alcool amylique de dissoudre la paraffine en toutes proportions à 45-50° pour opérer comme il suit : au sortir de l'alcool à 95°, passer par trois bains successifs d'alcool amylique, puis dans un mélange à partie égale d'alcool amylique et de paraffine, maintenu à l'étuve à 55°, et enfin dans trois bains de paraffine pure.

L'alcool butylique normal a été conseillé par Mlle LARBAUD. Il permet le passage direct de ce liquide dans la paraffine et n'altère pas les colorations en masse. On opèrera comme pour l'alcool amylique, par le procédé des trois bains. L'emploi de cet alcool a encore l'avantage de beaucoup faciliter les coupes dans les objets durs.

On peut aussi imprégner par la glycérine pendant la déshydratation pour éviter le durcissement.

On peut déshydrater par l'acétone.

Mais la déshydratation par l'alcool éthylique reste toujours la méthode de choix.

2. - *Imprégnation par un dissolvant de la paraffine :*

Cette opération consiste à chasser par un dissolvant de la paraffine l'alcool qui imprègne l'objet déshydraté. Beaucoup d'auteurs donnent à ce temps de l'inclusion le

nom d'éclaircissement parce que les liquides employés sont généralement des hydrocarbures ou des essences aromatiques, doués d'une haute réfringence et qui rendent les tissus transparents. Ces liquides, dits intermédiaires, doivent être solubles en toutes proportions dans l'alcool qui les précède et dans la paraffine qui les suit.

Les dissolvants de la paraffine les plus employés sont le benzol, le toluène, le xylol et l'essence de bois de cèdre. Lorsqu'on veut conserver la graisse dans les tissus fixés par des mélanges osmiés, il faut employer le chloroforme ou mieux l'éther de pétrole.

Les meilleurs intermédiaires, d'après APATHY, sont ceux qui dissolvent le mieux la paraffine à froid, qui ont le point d'ébulition le plus bas et qui ont une densité supérieure à celle de la paraffine. Le benzol et le toluène sont les plus volatils et par conséquent les plus faciles à éliminer ; ce sont aussi les moins chers. Le xylol ne présente pas d'avantage particulier ; il est beaucoup plus cher et il durcit énormément les objets. On ne comprend pas pourquoi il est toujours conseillé.

Technique de l'imprégnation. — L'emploi du mélange d'alcool et d'hydrocarbure est une complication inutile.

Pour la grande majorité des cas, il suffit de décanter le dernier alcool absolu et de verser sur la pièce une quantité de toluène suffisante pour la bien recouvrir. Si ce liquide ne se trouble pas, c'est que la déshydratation a été parfaite. L'alcool étant moins dense que le

toluène gagnera les parties superficielles du liquide. Le phénomène est donc inverse de celui qui se produit lors de la déshydratation. Aussi, P. MASSON recommande-t-il de vreser sur les pièces une hauteur de liquide suffisante pour que celles-ci, après équilibre, se trouvent dans une couche de toluène pur. Il en résulte qu'on ne doit pas agiter le liquide pendant l'imprégnation. Ne pas craindre d'employer du toluène en excès car ce produit est facile à récupérer par décantation.

Durée de l'imprégnation. — On n'a pas à s'en préoccuper avec l'essence de cèdre, car les objets peuvent y séjourner presque indéfiniment sans s'altérer. Il n'en est pas de même pour les hydrocarbures qui durcissent beaucoup.

Avec l'essence de cèdre (qu'il ne faut pas confondre avec l'huile de cèdre), l'imprégnation est finie lorsque la pièce tombe au fond du tube et paraît bien transparente.

Avec le toluène, il faut renouveler au moins trois fois le liquide et chaque bain doit durer de dix à trente minutes suivant le volume de l'objet. Celui-ci doit devenir transparent ou au moins translucide.

Quel que soit le mode d'imprégnation, le point essentiel est d'éliminer toute trace d'alcool absolu. C'est pourquoi lorsqu'on utilise le xylol ou le toluène, il faut renouveler le liquide au moins trois ou quatre fois jusqu'à ce qu'il ne se produise plus, soit au moment du changement de liquide, soit après repos, des stries indi-

quant la présence de couches de densité et d'indice de réfraction différentes. La réussite de l'inclusion dépend de la rigueur avec laquelle l'alcool absolu a été éliminé.

3. - *Bain de paraffine :*

L'imprégnation de l'objet par la paraffine ne peut être effectuée à froid, dans une solution de paraffine, que l'on concentrerait par évaporation de manière à avoir finalement une masse de paraffine solide. En effet, la paraffine ainsi obtenue est molle et spongieuse. Pour réaliser une masse solide et homogène, il faut imprégner l'objet à chaud, dans la paraffine en fusion.

La meilleure paraffine est celle qui fond à 55° : c'est la seule qui soit propre à tous les usages. Elle permet, dans les pays tempérés, de faire de bonnes coupes de toutes les épaisseurs et n'a pas l'inconvénient de soumettre les pièces à une température plus élevée. P. MASSON a reconnu que la température optima pour les coupes est de 30 à 35° inférieure au point de fusion de la paraffine employée.

La paraffine trop tendre ne permet pas d'obtenir des coupes très fines (de 6 à 9 u) tandis que la paraffine trop dure risque de cuire les pièces et fournit difficilement des coupes en rubans.

Pourtant, dans les pays chauds, on peut être obligé de se servir de la paraffine à 60° ; mais là encore, on peut tourner la difficulté en faisant l'imprégnation à 55° et en ne prenant la paraffine à 60° que pour l'inclusion définitive.

Chauffage de la paraffine. — Pendant toute la durée du bain, la paraffine doit être maintenue au voisinage de son point de fusion. Pour assurer la constance de cette température, on ne peut pas chauffer la paraffine à feu nu. Il faut se servir d'une étuve ou d'une plaque métallique.

On emploie le plus souvent une étuve d'un type voisin de celui employé en bactériologie, mais de petit volume. Il faut la préférer aux plaques métalliques du type MALASSEZ, par exemple, car avec celle-ci la température serait moins régulière et il y a toujours un danger à laisser, la nuit, une flamme sans surveillance.

Durée du bain de paraffine. — Les avis sont très partagés sur ce sujet, mais les opinions les plus autorisées s'accordent sur deux points :

1° La durée du bain doit être aussi courte que possible pour les objets faciles à pénétrer et à couper ou qui durcissent facilement.

2° Il n'y a aucun inconvénient à prolonger la durée du bain pour les objets peu perméables, tels que la peau.

Dans le premier cas, la durée du bain de paraffine sera de trente minutes à une heure ou deux heures, suivant le volume de l'objet et la tendance qu'il peut avoir à durcir.

Dans le second cas, on pourra laisser la pièce dans la paraffine pendant dix à douze heures ou même plus,

pourvu que la température ne dépasse pas notablement le point de fusion.

Les insuccès qu'on attribuait autrefois au bain de paraffine proviennent d'une mauvaise déshydratation ou d'une élimination insuffisante de l'alcool absolu. Une pièce bien déshydratée et bien désalcoolisée peut rester longtemps dans la paraffine fondue et subir les écarts de température, sans qu'il en résulte aucun dommage.

Technique du bain de paraffine. — Ici encore, nous devons considérer comme généralement superflus les bains préalables dans les mélanges de paraffine et de dissolvant ou dans une paraffine un peu molle. C'est du moins l'avis de LANGERON. D'après cet auteur, on peut transporter directement les objets du liquide d'imprégnation (toluène ou essence de cèdre) dans la paraffine en fusion. Il n'y a pas à craindre d'altérations, même pour les objets les plus délicats, surtout quand ces derniers sortent de l'huile de cèdre. Bien entendu, ce transport sera fait avec précaution, pour ne pas endommager les pièces .Le contenu du tube sera vidé dans un petit cristallisoir et l'objet sera saisi avec des pinces ou transporté avec une spatule de métal ou de carton léger.

Il faut avoir bien soin que l'objet baigne immédiatement dans la paraffine, sans surnager, accident qui amènerait des dommages irréparables, par suite de la dessiccation. L'étiquette, écrite au crayon ou à l'encre de Chine, qui a suivi les objets dans les divers liquides, doit les accompagner encore dans la paraffine.

Pour assurer l'élimination complète du dissolvant, il faut employer trois bains successifs dont la durée variera suivant le volume de la pièce mais qui se répartiront de préférence sur 24 heures.

Les deux premiers bains peuvent servir indéfiniment pour les dissolvants volatils, mais non pour l'essence de cèdre.

D'ailleurs, les intermédiaires, même les plus volatils, sont très difficiles à éliminer. Ils ne se séparent de la paraffine qu'à des températures très supérieures à son point de fusion. C'est pourquoi il faut encore appliquer ici la méthode des dilutions successives de P. MASSON, comme pour l'élimination de l'eau et de l'alcool. Celle du toluène (ou autre intermédiaire) est tout aussi nécessaire car des traces de ce dissolvant diminuent suffisamment la consistance de la paraffine pour compromettre la fabrication des coupes.

En outre, s'il reste un dissolvant volatil dans les tissus inclus, il s'évapore au moment où l'on exécute les coupes, et les tissus prennent l'aspect ratatiné qu'on attribuait autrefois à la cuisson par un séjour trop prolongé dans les bains de paraffine. Comme l'a si bien dit P. MASSON : « l'aspect cuit tient à un défaut de cuisson ».

4° - *Inclusion définitive :*

L'objet est sorti du dernier bain de paraffine et transporté dans un moule rempli de paraffine fondue. Le tout est refroidi d'abord à l'air, puis sous l'eau. La paraf-

fine destinée à l'inclusion doit n'avoir jamais servi pour des bains et ne renfermer aucune trace de dissolvant. Dans le cas contraire, elle forme en se solidifiant une masse pâteuse et blanchâtre, avec laquelle il est impossible d'obtenir des coupes. Il en est de même lorsqu'elle a été chauffée longtemps au contact de l'eau ou de la vapeur d'eau.

L'étuve à paraffine ne devra donc servir qu'à cet usage pour éviter toute altération de la paraffine.

Il existe diverses sortes de moules : verre de montre à fond plat, capsules d'étain. Pour inclure les grandes pièces il est préférable de se servir des barres de LEUCKART ou d'un moule analogue. Ces moules sont constitués par deux pièces métalliques rectangulaires qu'on pose sur une lame de verre et qu'on rapproche plus ou moins, suivant la dimension du bloc à obtenir. Ils donnent de très beaux blocs cubiques, faciles à manipuler et à ranger.

Technique de l'inclusion. — On remplit le moule de paraffine fondue au point de fusion et tenue en réserve dans une casserole. Puis, sans perdre de temps, on sort la pièce du bain de paraffine avec une pince chauffée et on la porte dans le moule. Cette manœuvre demande une certaine dextérité car, si on laisse trop refroidir la paraffine ou l'objet, ce dernier est mal inclus et ne fait pas corps avec la masse du bloc.

Il ne suffit pas de déposer l'objet dans le moule ; il faut encore l'orienter, c'est-à-dire le disposer de telle

sorte que la surface qui doit être coupée coïncide avec un côté détermnié du moule. Pour cela, on se sert encore de la pince chauffée. L'objet est facile à immobiliser sur le fond et les faces du moule, formant une masse pâteuse, dans laquelle on enfonce l'objet en bonne place. L'orientation terminée, il faut refroidir la paraffine. La majorité des auteurs recommande d'opérer ce refroidissement très rapidement, de manière à éviter la cristallisation de la paraffine. Pour pratiquer le refroidissement, on prépare un cristallisoir plein d'eau, on fait flotter le moule, si sa forme et son poids le permettent. Dans le cas contraire, on attend simplement que la surface soit couverte d'une pellicule assez épaisse, dont on accélère l'apparition en éventant le moule. Dès que ce résultat est obtenu, on immerge doucement. Cette immersion demande quelques précautions, autrement la paraffine, encore liquide, pourrait être projetée hors de la pellicule, accident qui amènerait la formation, dans le bloc, de cavités remplies d'eau. On laisse les pièces dans l'eau de vingt minutes à une demi-heure, plus encore pour les blocs volumineux. Après refroidissement complet, on démoule.

Nous nous sommes assez longuement étendu sur cette technique car c'est d'elle que, sur le conseil de M. le Professeur LOMBARD, nous sommes parti pour élaborer une méthode s'appliquant spécialement aux pâtés. Aussi nous a-t-il paru utile de nous appesantir sur des détails qui, s'ils ne sont pas parfaitement connus du préparateur, entraîneront des échecs nombreux et poseront des problèmse insolubles au débutant. Les

conseils donnés plus haut devront donc être retenus et appliqués à la méthode d'inclusion des pâtés.

Au Laboratoire d'Hygiène des Denrées Alimentaires de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse, nous utilisons la méthode suivante :

1. — PRÉLÈVEMENTS.

Il est bon d'effectuer quatre prélèvements : deux au centre de la masse du pâté, deux à la périphérie. L'inclusion ne portera que sur un de chaque sorte et les deux autres seront gardés dans l'alcool absolu jusqu'à la fin des opérations. C'est une précaution qui ne saurait être négligée car elle permet de rattraper des confusions qui auraient pu se produire et qui pourraient avoir de graves répercussions.

Si le pâté est assez consistant, ce qui est le plus souvent le cas lorsque le produit n'a pas été trituré auparavant au laboratoire pour faire une analyse chimique, par exemple, les prélèvements sont effectués au moyen d'un couteau propre, qui permet de découper, dans la masse du pâté, des parallélipipèdes de 1 cm sur 2 cm et 1/2 cm. de haut.

Si le produit n'a pas une consistance suffisante on peut soit en faire une boulette dans les doigts, soit le mouler dans des barres de LEUCKART. On laisse tomber avec précaution le prélèvement dans le récipient où sera mis le liquide déshydratant.

2. — Déshydratation.

Le prélèvement est mis dans un pot-banc, sorte de petit récipient ayant la forme des ventouses utilisées en thérapeutique humaine. Ces récipients sont recouverts d'un verre de montre ce qui est un couvercle suffisant pour éviter une évaporation trop intense et la souillure par les poussières de l'atmosphère.

La déshydratation peut être commencée par l'alcool à 95° pendant 12 à 24 heures. Mais pour accélérer, on met directement dans l'alcool absolu. Le temps de déshydratation est très variable pour les pâtés car leur teneur en eau n'est pas fixe. Il est, en effet, une fraude courante qui consiste à ajouter de l'eau au moment du brassage de la pâte. Cette fraude, dépistée par l'analyse chimique, provoque parfois un certain retard dans la déshydratation.

Si le résultat doit être donné rapidement, on pourra changer l'alcool absolu toutes les six heures et même plus souvent. Mais le prix de revient de l'opération s'élève. On aura avantages à ne le changer que toutes les dix ou douze heures, le plus souvent deux bains suffisent et nous conseillons, à cet égard, le prélèvement étant très fragile de pratiquer plutôt la décantation que le transvasement.

Lorsque le toluène ne se trouble plus au contact de la masse à inclure, la déshydratation est achevée.

3. — IMPRÉGNATION.

Pour les mêmes raisons que précédemment, puisque la paraffine n'est pas miscible dans l'alcool, on imprègne de toluène. Pratiquement, pour éviter des manipulations, nous ne faisons qu'un seul bain de toluène. Le pot-blanc en est rempli jusqu'à moitié et le prélèvement y séjourne jusqu'à ce qu'il ait pris une teinte un peu transparente ou un peu noire. L'optimum est facile à juger à l'œil. Le temps de séjour, là aussi, est assez variable : il varie avec la teneur en graisse du produit et la grosseur des particules. En général, 12 à 18 heures suffisent. La quantité de toluène utilisée doit être assez grande pour que l'alcool ne soit plus au contact du produit. Mais, d'une part, ce produit est récupérable et, d'autre part, il n'en est pas utilisé plus que si on avait pratiqué plusieurs bains successifs. Le prélèvement acquiert une assez grande consistance ; il ne tend pas à s'écraser mais plutôt à se déliter.

Pour y obvier, nous avons essayé de mettre le pâté dans un tube dont une extrémité est fermée par un bouchon de coton et l'autre extrémité par un linge retenu par une ligature, selon la technique d'inclusion des petits objets de CAULLERY et CHAPELIER. Cette technique ne nous a pas donné de bons résultats car les liquides ne pénètrent pas également dans toutes les parties de la masse du prélèvement.

Lorsque le prélèvement a atteint une teinte optima, il est porté à l'étuve à 56° et mis dans un mélange à

parties égales de toluène-paraffine pendant 8 heures environ. La substitution de la paraffine au toluène est ainsi amorcée. Temps nécessaire non pas tant par crainte de détériorer les tissus, mais parce que la paraffine contenue dans cette solution pénètre plus intimement les tissus, ce qui permet d'avoir par la suite une meilleure inclusion.

Ce mélange toluène-paraffine peut être utilisé indéfiniment ; il est toujours dans l'étuve, contenu dans des flacons bouchés.

4. — Bain de paraffine.

Dans l'étuve à 56° se trouvent constamment aussi de petits récipients circulaires contenant de la paraffine en fusion et un récipient plus grand contenant une paraffine ne servant à aucun bain.

Les récipients utilisés pour les bains sont munis intérieurement de paniers de toile métallique mobiles.

Le prélèvement est mis dans ce panier et celui-ci immergé dans la paraffine. Au bout de 8 à 10 heures, le panier retiré permettra de sortir le prélèvement sans risquer de le détériorer.

Ce système de panier aurait avantage à être généralisé à tous les bains car il évite toute manipulation du prélèvement.

5. - Inclusion proprement dite.

Le prélèvement, sorti de la paraffine, est posé sur une lame de verre suivant une de ses faces planes. Il est entouré des barres de Leuckart et de la paraffine n'ayant jamais servi à un bain est coulée dans ce moule avec une cuillère spéciale.

Le bloc est laissé à refroidir à l'air ou à l'eau, dans les conditions de la précédente technique.

Nous recommandons de ne pas mettre à la glacière, comme on serait tenté de le faire car, d'après les recherches de Carazzi, des cristaux pourraient se former, ce qui nuirait à l'homogénéité de l'inclusion.

Comparaison des différentes techniques d'inclusion

Les méthodes allemandes demandent beaucoup de manipulations et d'instruments. Les chercheurs de ce pays ont toujours eu le culte des instruments nouveaux et en ont invité de spéciaux pour leurs analyses histologiques. Il est vrai qu'il est facile de fabriquer au laboratoire les instruments nécessaires.

Reproche plus sensible : la longueur de la méthode et la difficulté des manipulations. Aussi les Allemands ne durcissent-ils plus présentement dans le formol et coupent-ils au microtome à congélation.

Les deux grands griefs que l'on peut faire à la méthode allemande sont :

1° La gélatine, n'étant pas éliminée, se colore assez fortement et donne une préparation souillée de tâches qui rendent la lecture difficile. D'autre part, la gélatine contenue frauduleusement dans le pâté à examiner n'est pas vue lors de l'examen, ce qui fausse le résultat.

2° La coupe après congélation, si elle est rapidement faite, n'est jamais aussi mince qu'une coupe pratiquée après inclusion dans la paraffine. Certains histologistes très expérimentés arrivent à effectuer de très bonnes coupes à la congélation, mais c'est là l'exception et pour arriver à ce résultat il faut une longue pratique jalonnée de nombreux échecs. En matière d'hygiène des denrées alimentaires les retards sont toujours à éviter.

C'est pour ces raisons que POISSON a mis au point la méthode d'inclusion mixte gélose-paraffine. Le reproche qu'on peut lui adreser, en dehors de la multiplicité des manipulations, c'est de ne permettre l'inclusion que des produits finement hachés. POISSON conseille, nous l'avons vu, lorsque les fragments ne sont pas assez petits, de compléter cette division en hachant à nouveau le produit. Tous ceux qui ont examiné au microscope une préparation de pâté se rendront compte de l'erreur. Il faut, au contraire, chercher à garder les éléments les plus volumineux. La diagnose sur de petits fragments est encore plus délicate que sur des plages plus grandes.

L'inclusion à la paraffine, selon la technique classique d'histologie des tissus crus, n'offre pas ces inconvénients et garde les rapports entre les différents éléments. Elle permet de juger de la composition réelle du prélèvement, les manipulations n'ayant pas altéré les rapports.

Qu'il nous soit permis de donner, à titre d'exemple, le pâté américain examiné au Laboratoire le 15 octobre 1946.

C'est un pâté rose clair, de densité assez grande, d'un goût légèrement sucré. C'est le pâté de viande que tous les Français ont mangé quelque temps après que les troupes anglo-américaines eurent débarqué.

L'examen microscopique y révélait la présence de graisse assez abondante, du muscle, du conjonctif en faible quantité et un peu de gélatine. C'était donc là un bon pâté. Mais ce qu'il a de remarquable, c'est qu'il était possible, sur la coupe, de voir que le tissu musculaire était intimement lié au tissu adipeux, que les fragments présentaient une partie de tissu musculaire et une partie de tissu adipeux, ce qui permettait de supposer que le pâté avait été fait à partir de viande présentant peut-être du marbré et probablement du persillé. Ainsi est-il permis de juger de la qualité de la viande utilisée, et c'est là une grande précision qu'il ne faut pas négliger. Aucune méthode autre que l'inclusion à la paraffine ne permet ce résultat car les tissus sont fortement transformés par les malaxages et l'action des dissolvants.

La méthode d'inclusion à la paraffine suivant la technique histologique normale peut être pratiquée si le résultat ne presse pas.

Cependant ces avantages ne sont pas très grands sur la méthode accélérée que nous recommandons. La technique accélérée conserve tous les avantages de la technique histologique normale et donne entière satisfaction pour la plupart des examens que nous avons pratiqués. Il faut d'ailleurs honnêtement remarquer que cette technique n'est pas possible lorsqu'on est en présence d'une véritable bouillie. Il n'y aurait d'ailleurs, dans ce cas, aucun intérêt à chercher à conserver les rapports des constituants, ces rapports ayant été rompus depuis longtemps. Pour ces pâtés contenant une forte proportion d'humidité ou de graisse à point de fusion très bas, comme la graisse de cheval, nous conseillons la méthode de Poisson.

Mais il faut remarquer qu'il est rare que l'on en soit réduit à pratiquer cette méthode trop longue. La consistance de la plupart des pâtés permet de confectionner de petits blocs assez consistants pour être déshydratés et éclaircis sans se déliter. Avec un peu d'habitude il sera facile de juger de la méthode à employer d'après l'aspect du pâté.

Nous conseillons donc l'emploi d'une façon courante de l'inclusion accélérée à la paraffine et exceptionnellement l'emploi de l'inclusion mixte à la gélose-paraffine.

II. — DE LA COUPE

Nous n'entrerons pas dans les détails de la technique. On pourra les trouver dans tous les traités d'histologie ou de microscopie.

Néanmoins, pour éviter les tâtonnements, nous nous permettrons de donner ici quelques conseils.

Il faut remarquer tout d'abord que la température ambiante, la température de la paraffine et l'inclinaison du rasoir sont d'une grande importance. De la qualité de l'inclusion, dépendent aussi grandement les difficultés ou les facilités pour effectuer les coupes.

Avec des pâtés, il est assez rare d'obtenir des coupes de tout le prélèvement d'un seul tenant, surtout lorsque le produit contient un peu de cartilage, ce qui arrive parfois. Il faut néanmoins chercher à obtenir des coupes de 6 μ d'épaisseur environ.

Si la coupe, sous le rasoir, se délite en petites particules, on aura avantage à réchauffer le bloc avec son haleine. Quand la coupe se plisse finement, on pourra faire évaporer sur le bloc un peu d'un liquide volatil comme l'alcool, le toluène et au besoin l'éther.

Pour coller les préparations sur les plaques, on peut employer l'albumine en solution au vingtième, mais cette solution ne se conservera que peu de temps. Il faut bien laver et même désinfecter le flacon avant d'y mettre la solution et on peut ajouter un grain de thymol.

Nous avons l'habitude de mettre sur la lame une grosse goutte de la solution d'albumine et de laisser tomber la pellicule coupée par son côté convexe sur cette goutte. L'étalement est commencé par une lancette, puis le dessous de la lame est rapidement passé sur la veilleuse d'un bec Bunsen.

Ce temps demande une grande habitude, car il ne faut pas que la température soit trop élevée. L'albumine serait coagulée ; la paraffine fondrait, disperserait les fragments et même parfois de petites bulles viendraient s'interposer entre la lame et la préparation.

Après étalement, quand tout est bien refroidi, on appuie sur la coupe, avec l'index, un linge fin, pour que la préparation adhère bien à la lame de verre.

Il ne faut jamais laisser sécher à la température du laboratoire. Les coupes se décolleraient.

On les fera sécher, soit sur une platine légèrement chauffante, platine qui peut aussi être utilisée pour l'étalement, lorsque l'opérateur est encore inexpérimenté, soit à l'étuve à 37° ou à la rigueur à 56°, en laissant un peu la porte ouverte pour éviter la fusion de la paraffine de la coupe.

Ce séchage demande 2 à 3 heures environ pour éviter tout décollement.

Les plaquse refroidies sont prêtes pour la coloration.

III. — DE LA COLORATION

Pour permettre l'imprégnation par les différents colorants, il faut d'abord dissoudre la paraffine, puis réhydrater.

Pour dissoudre la paraffine, on fait couler goutte à goutte sur l'extrémité de la lame, soit du toluène, soit du xylol. La lame est inclinée pour que le dissolvant saturé s'écoule. La préparation devient transparente et presque invisible sur la plaque.

Pour chasser le dissolvant, on verse alors pareillement de l'alcool absolu. On alterne dissolvant et alcool absolu jusqu'à ce que toute trace de paraffine ait disparu.

Une bonne coupe est pratiquement invisible lorsqu'elle est en contact avec le toluène pour la deuxième fois. La coupe réapparaît sous l'alcool absolu. La réhydratation est commencée par l'alcool à 95°. La plaque est ensuite mise dans un petit bac à rainure plein d'eau pour terminer l'opération.

Cette réhydratation est faite dans le but de permettre aux colorants en solution aqueuse ou hydro-alcoolique de mieux imprégner les tissus.

— Colorations proprement dites.

BREUSCH trouve que l'hématoxyline-éosine est la meilleure méthode.

D'après ce même auteur, le Giemsa n'est pas à déconseiller, mais il reproche à cette méthode qu'il pratique

après inclusion à la gélatine de trop colorer la matière d'inclusion.

Le Ziehl à l'Orcéine — Bleu de méthylène qui fait paraître les caractères des fibres élastiques, donne des images très intéressantes. Les bactéries se colorent, ainsi que les spermatozoïdes dans les canaux des testicules.

Toutefois, BREUSCH ne l'a pas beaucoup employée, à cause de sa sensibilité.

La coloration de Calleya fournit des images aux couleurs magnifiques et montre en couleurs différentes les fibres musculaires striées, les épithéliums et le tissu conjonctif.

D'après BREUSCH, ces méthodes ne doivent être considérées que comme des colorations spéciales et ne doivent être employées que dans les cas douteux.

Mais l'hématoxyline-éosine est sûre, rapidement exécutée et peu sensible. C'est pourquoi elle est très employée en Allemagne.

GLAMSER, sur des coupes de 10 à 15 μ d'épaisseur colore au Giemsa pendant 20 à 30 minutes.

Nous sommes de l'avis du Professeur DRIEUX. Dans la pratique courante, la meilleure coloration est la simple hématéine-éosine qui donne des résultats excellents, à la condition d'employer des colorants de qualité extra. Cet auteur emploie pour préciser certains détails la coloration de Van GIESON (pour le collagène), les colorations trichomiques et même la coloration de Ziehl pour les bacilles tuberculeux.

Au Laboratoire de l'Ecole de Toulouse, plusieurs colorations à l'hématéine-éosine sont pratiquées pour chaque prélèvement. D'autres colorations électives sont utilisées si cela semble nécessaire pour préciser des détails : par exemple, le Ziehl pour déceler des BK, la coloration à l'hématéine Picro-Ponceau. Les images obtenues par cette dernière coloration sont magnifiques.

Nous décrirons particulièrement la coloration à *l'hématéine-éosine*, car c'est la plus simple, la plus pratique, la moins minutieuse, la plus facilement réussie dès la première fois que l'on colore une préparation.

Dans un premier temps, on colore à l'hématéine de Mayer.

Préparation du colorant :
On prépare une solution A.

Alun de potasse	50 gr.
Eau distillée	1000 cm3

La solution B est préparée séparément.

Hématéine d'Ammoniac de Grübler	1 gr.
Alcool à 93°	25 cm3

Porter à ébullition la solution A.
Y faire tomber peu à peu la solution B.

Prolonger l'ébullition jusqu'à réduction de moitié. Ajouter un cristal de thymol ou de camphre afin d'éviter le développement des moisissures. Filtrer au moment de l'emploi.

Pour cette coloration, nous employons des tubes de Borrel, ayant un prisme à l'intérieur, ce qui permet d'utiliser peu de colorant et de colorer trois plaques en même temps.

L'hématéine fabriquée depuis un certain temps est de meilleure qualité que lorsqu'elle est fraîche. Néanmoins, lorsqu'elle est trop vieille, elle ne colore plus assez.

Les préparations sont laissées pendant dix minutes dans les tubes de Borrel, puis lavées dans des petits bacs à rainures.

On colore ensuite pendant trois minutes par une solution d'éosine à 1 %.

Après un nouveau lavage, on essuie autour de la préparation avec un linge sec. La coupe est alors prête à être montée.

— *La coloration à l'hématéine-Picro-Ponceau.*

On laisse la préparation pendant vingt minutes environ dans l'hématéine. On lave comme précédemment et on colore ensuite pendant une à deux minutes par la solution de Picro-Ponceau. On essuie comme précédemment, la préparation est prête à être montée.

La solution de Picro-Ponceau employée est ainsi composée :

Solution aqueuse saturée d'acide picrique .	8 parties
Ponceau Extra S à 2 %	2 parties
Acide acétique glacial	V gouttes

Le montage :

Habituellement, on monte au baume du Canada. Ce montage a pour but d'éclaircir la préparation et de la mettre à l'abri de l'air, ce qui permet une longue conservation.

Ce montage comprend en gros deux temps : La déshydratation et le montage proprement dit.

La déshydratation est très importante, car c'est de ce temps que dépend la réussite du montage au baume. Les lames bien essuyées autour de la préparation sont d'abord mises dans des tubes de Borrel contenant de l'alcool à 95°, ce qui commence la déshydratation et économise l'alcool absolu. La lame est de nouveau bien essuyée et on verse par trois fois de l'alcool absolu sur la préparation. Cet alcool a été conservé dans un flacon bouché à l'émeri.

Verser suivant la longueur de la lame, de manière à chasser l'alcool hydraté qui imprègne les coupes. Balancer la lame pour que les coupes soient bien pénétrées par le liquide. Une grande quantité n'est pas nécessaire : on peut déshydrater une lame avec quelques centimètres cubes, à condition d'opérer méthodiquement et rapidement.

Il faut agir vite car l'humidité de l'évier au-dessus duquel on se trouve, ou même l'haleine de l'opérateur suffisent à hydrater l'alcool. On essuie le pourtour de la préparation avec un linge impeccablement sec. Une grosse goutte de toluène recouvre la préparation. Si

ce toluène se trouble, la déshydratation est incomplète ; il faut recommencer jusqu'à ce que la préparation, vue sur fond noir, miroite uniformément, sans le moindre nuage.

Quand ce résultat est obtenu, on jette rapidement l'excès de toluène, on essuie rapidement le pourtour de la préparation avec le linge parfaitement sec. On dépose une goutte de Baume du Canada naturel, on recouvre d'une lamelle.

Ces derniers temps doivent être opérés très rapidement, sans quoi la préparation est voilée par un nuage blanchâtre. Ce nuage s'atténue parfois un peu au bout d'un certain temps ; néanmoins, il faut toujours l'éviter.

Une préparation voilée est sans valeur.

L'accident qui arrive souvent est l'emprisonnement de bulles d'air dans le baume.

Pour éviter cet accident, il faut étendre la goutte de baume sur la préparation jusqu'à l'endroit où on posera un des côtés de la lamelle. La lamelle ne doit pas être lachée brusquement, mais retenue avec une lancette.

On peut appuyer sur la lamelle pour chasser les bulles qui, malgré cette précaution, auraient été retenues.

La quantité de baume déposée sur la lame doit être proportionnée à la surface de la lamelle, pour éviter les bavures. Si ces bavures existaient, il faut attendre que le baume soit complètement sec pour les gratter. Il ne

faut jamais employer, ni toluène, ni xylol pour les enlever, car ces liquides pénétrant entre la lame et la lamelle produisent un nuage.

Pendant toutes les opérations, depuis le toluène qui a dissout la paraffine, il faut veiller attentivement à ce que les lames soient toujours dans un liquide et ne sèchent pas entre deux opérations.

De l'étiquetage :

Les confusions sont très faciles à faire. Elles auraient comme résultat de forcer l'opérateur à tout recommencer à partir des prélèvements de sécurité que nous avons conseillé de faire.

Il est inutile de souligner quelles graves et irréparables conséquences une erreur de cet ordre pourrait entraîner.

Pour que cette méthode garde la confiance de ceux qui confient des prélèvements, il ne faut absolument pas d'erreurs.

Nous conseillons d'inscrire un numéro à l'encre de chine ou au crayon sur un morceau de papier qui suivra le prélèvement dans les différents liquides pendant l'inclusion. Le temps où se produisent le plus souvent des confusions est celui du moulage des blocs.

Aussi, conseillons-nous de graver sur le bloc le numéro aussitôt le refroidissement. Les plaques seront marquées au fur et à mesure de la mise à sécher à l'aide d'un crayon spécial pour écrire sur le verre.

Conclusion sur les techniques

La part réservée à l'inclusion peut paraître trop importante. Elle a été discutée dans tous les journaux professionnels allemands. Mais ce temps est le plus délicat pour le préparateur.

Nous avons cherché à décrire les techniques avec le plus de précision possible.

M. le Professeur LOMBARD le dit souvent : « Il faut suivre la technique ». C'est, en effet, le fruit de nombreuses observations et remarques. Par elle, bien des tâtonnements sont évités.

Lorsque des spécialistes auront pratiqué plusieurs fois la méthode préconisée, ils trouveront certainement, à leur tour, des améliorations aux problèmes qui leur sont posés. Car la technique n'est qu'une longue habitude au service de l'expérience.

Ainsi, chacun arrive, par la pratique raisonnée, à se faire une technique qui, parfois, n'est pas meilleure qu'une autre, mais donne de très bons résultats entre ses mains.

III. — DE L'INTERPRÉTATION DES COUPES

Les différents auteurs donnent de longues listes de ce que l'on peut trouver dans les pâtés. Les Allemands signalent des fraudes très astucieuses, par exemple la substitution au lard, dans les saucisses, de dés de matrice,

Quelques auteurs allemands ont publié des séries de micro-photos (SCHONBERG en particulier) relatives à des prélèvements de saucisses de Frankfort. Mais les tissus n'ont pas le même aspect que lorsqu'ils ont été manipulés pour la fabrication des pâtés.

POISSON écrit : « La lecture des coupes est facile pour qui connaît les différents aspects que peuvent présenter tissus et organes après les manipulations et la cuisson ».

Cette phrase sous-entend qu'il faut un véritable apprentissage pour déchiffrer rapidement n'importe quelle préparation.

En effet, certains tissus gardent remarquablement leur structure, tandis que d'autres sont beaucoup plus altérées, particulièrement dans leurs affinités tinctoriales.

Il est remarquable de retrouver pratiquement intacts les glandes de la peau, les poils tactils à sinus sanguins des lèvres, le cartilage, les muscles. Dans les muscles remarquablement conservés, alternent les disques sombres et les disques clairs aussi bien que dans un tissu cru.

En voyant ainsi la conservation de ces tissus, on ne peut s'empêcher de penser aux précautions prises habituellement pour la fixation de ces tissus en histologie normale et pathologique !

Lorsque l'on doit faire une coupe de poumon suspecté de tuberculose, diagnostic souvent demandé au laboratoire, tous les histologistes prennent de grandes

précautions de fixation, d'inclusion... Pourtant, ce poumon cuit à 120° une demi-heure, une heure et parfois plus, stérilisé même deux fois, comme certains pâtés qui nous ont été présentés, gardera sa structure ; les cellules géantes seront intactes, les BK pourront être parfaitement colorés.

Examen des différents tissus :

Le *tissu musculaire* strié se présente le plus souvent sous forme de fibres isolées et fragmentées.

Elles se colorent en rouge brique par l'hématéine-éosine. La persistance de la structure microscopique du muscle dans les produits de charcuterie a déjà été remarquée par F. LUCAM et E. MATHIEU.

Ces auteurs observent que la structure n'est altérée dans aucun des produits qu'ils ont examinés : jambon, saucisses, bœuf assaisonné conservé en boîtes, viandes séchées ou « Tasajo ». Nous avons observé la même chose dans les pâtés.

Ces auteurs remarquent que dans les saucissons, la structure striée des fibres ne persiste qu'en de très rares points, sans doute à cause des fermentations.

Il serait donc intéressant d'examiner si les pâtés fabriqués avec des viandes altérées n'ont pas subi la même transformation, ce qui serait logique. Dès lors, à l'examen microscopique, on pourrait, à la vue du muscle, suspecter l'état de putréfaction des produits employés.

Le tissu musculaire lisse est facilement reconnaissable aussi car il a la même coloration. Les fibres sont plus grêles. On y voit parfois le noyau.

On trouve du muscle lisse ou strié dans tous les pâtés et, à première vue, par un examen rapide, on peut dire si on est en présence d'un bon ou d'un mauvais pâté, suivant la proportion de fibres musculaires que l'on y rencontre.

Il ne faut, du reste, pas être trop absolu dans ce premier jugement car on peut être en présence de fibres lisses d'utérus ou de vessie. Il faudra, par la suite, toujours rechercher, l'épithélium ou les glandes aux fins de diagnostic.

Il est possible de voir, par cette méthode, s'il a été incorporé des muscles parasités. Ainsi, a-t-il été examiné au Laboratoire un pâté provenant des U .S. A. dans lequel des larves de trichine, tuées par la chaleur, ont été mises en évidence. De même, une myosite chronique, des lésions musculaires sont parfaitement décelables.

Tendons. — Ce tissu est gélatinisé par la cuisson. Il se colore en violet clair par l'hématéine. Les différentes fibres sont accolées en beaucoup de points, mais néanmoins, par endroits, la plage se sépare en fragments et la ligne de séparation des fragments est crénelée. Les espaces entre les fibres ne sont pas entièrement comblés.

Dans la masse et à un assez fort grossissement, il est permis de les apercevoir. Ils se présentent un peu comme

des espaces stellaires clairs. La particule de tendon est généralement attenante à quelques fibres musculaires, ce qui aide le diagnostic. Les tendons ont un aspect légèrement différent suivant la partie du corps auquel ils appartiennent.

Dans les pâtés de viande de l'Armée, il est interdit de faire entrer des abats. Aussi, avons-nous vu un fabriquant malhonnête tourner le règlement et fabriquer du pâté avec une forte proportion de tendon. Ce pâté, examiné le 11 janvier 1947, présentait une couleur anormalement claire. Sa densité était normale. Très épicé, il était peu onctueux. A l'examen microscopique pratiqué par M. le Professeur LOMBARD, se décelaient :de la graisse, du tissu musculaire, et une grande quantité de tendon finement haché.

C'était une fraude très adroite car, sans la méthode histologique, elle n'aurait jamais été découverte.

Les aponévroses manifestent la même coloration que les tendons. L'enchevêtrement de leurs fibres est caractéristique.

Le *conjonctif* apparaît sous forme de toiles d'araignée, plus ou moins gélatinisé, avec quelques cellules par endroits. Lorsqu'il est enflammé, on y voit des amas de leucocytes.

Les pâtés de mauvaise qualité renferment une grande proportion de tissu conjonctif, d'aponévrose, de tendon et peu de muscle et de graisse. On y trouve, avec ces

éléments, des *vaisseaux*, et surtout des *nerfs* très caractéristiques.

L'aspect de ces derniers est identique à ce que l'on voit en histologie normale.

En étudiant la coupe, on a l'impresion que le charcutier a collecté tous ses déchets pour en fabriquer du pâté. Là encore, c'est une fraude qui n'aurait jamais été mise en évidence sans le secours du microscope.

Le *tissu adipeux* existe à peu près toujours sur les coupes. Son aspect en nid d'abeille est caractéristique Comme nous l'avons précédemment remarqué, il peut, dans le même fragment, faire corps avec des fibres musculaires, ce qui signe la qualité supérieure de la viande employée.

Le tissu adipeux, associé à la *gélatine*, facilement reconnaissable, elle, à son aspect homogène, forme le liant du pâté. Une fraude courante consiste à introduire une grande quantité de gélatine.

Il arrive que l'on trouve du *cartilage*. Il est très peu altéré par la cuisson. Les chondroblastes arrondis sont très visibles avec un ou deux noyaux.

Le *tissu pulmonaire* sera toujours recherché. Il ne doit pas être admis dans les pâtés. En effet, le poumon a peu de valeur nutritive. Or, il est vendu fort cher lorsqu'il est incorporé dans un pâté. A juste titre, l'armée n'accepte pas un pâté contenant du poumon.

Une forte proportion de ce tissu diminue la densité du produit. Aussi, lorsqu'un pâté a une faible densité,

une consistance un peu spongieuse, il faut suspecter l'inclusion de poumon.

Le poumon garde sa structure alvéolaire.

L'endothélium alvéolaire est parfois même conservé et, ce qui offre un gros intérêt, les lésions sont facilement décelables.

Qu'il nous soit permis de donner ici comme exemples d'analyse complète deux pâtés examinés par M. le Professeur LOMBARD - Pâté n° 23 et pâté n° 26.

Le premier examiné le 8 avril 1948. Pâté en vrac. La densité semble faible, couleur gris clair.

L'examen microscopique révèle la présence de :

Fibres musculaires striées assez régulièrement réparties ;

Fibres musculaires lisses en amas, par endroits ;

Tissu fibreux ou tendineux, quelque peu gélatinisé ;

Derme et hypoderme, glandes sébacées, poils, cellules de Langerhans ;

Tissu adipeux en pelotons ou plages (probablement hypodermique) ;

Poumon atélectasié (en grosses plages) et enflammé (lésions d'alvéolite fibreuse) ;

Myocarde avec péricardite chronique ;

Rein ;

Capsule surrénale ;

Ganglion lymphatique ;

Vaisseaux :
Amidon.

Pâté n° 26. - Pâté de densité faible, peu supérieure à la densité de l'eau. La partie superficielle desséchée a l'aspect d'une croûte brune, la partie interne, plus claire, a l'aspect d'une bouillie dans laquelle sont incluses quelques fibres musculaires.

L'examen microscopique révèle :

Fibres de muscle strié ;
Fibres de muscle lisse ;
Tissu fibreux ;
Derme (poils, glandes sébacées, poils tactiles à sinus sanguins) ;
Poumon œdématié ;
Parathyroïde ;
Tissus glandulaire (parotide ou pancréas) ;
Peu de tissu lymphoïde ;
Quelques fibres nerveuses myéliniques.

Conclusion : pâté pauvre en fibres musculaires et tissu adipeux, riche en tissu fibreux (derme surtout avec poils et glandes sébacées).

Comme on le voit par ces deux exemples, les lésions, même légères du poumon, peuvent être décelées, le fabricant peut être poursuivi pour fraude.

Le charcutier est passible des peines prévues par la loi du 1er août 1905 punissant tous ceux qui mettent en vente des denrées impropres à la consommation, corrompues ou toxiques.

Les tribunaux estiment qu'un boucher ou un charcutier, de par sa profession, connaît l'état et l'origine des viandes qu'il livre à la consommation.

Il sera donc possible d'argumenter et d'intenter une action lorsqu'on trouve des lésions caractéristiques et massives, spécifiques ou non.

Le *rein* n'est pas facile à reconnaître, car il est assez dissocié. Il donne un peu l'aspect de rein dégénéré. Néanmoins, il est rare de ne pas distinguer quelques glomérules, ou quelques tubes urinifères.

Les *glandes endocrines*, la plupart des *glandes exocrines* gardent remarquablement leur structure. Les auteurs allemands en ont publié de remarquables microphotographies.

Le *foie* est reconnaissable aux travées de REMAK qui sont le plus souvent conservées. La difficulté est assez grande lorsque le foie a subi une dégénérescence graisseuse ou une assez importante surcharge graisseuse.

Le foie de porc est parfois reconnu avec ses espaces portes caractéristiques.

La cirrhose se manifeste avec une grande netteté car le tissu fibreux a protégé le parenchyme hépatique à la cuisson et évité la dispersion des cellules hépatiques.

BREUSCH, qui est un spécialiste de l'examen des saucisses de foie, conseille, dans les cas douteux, de surajouter une coloration rapide à la solution de bleu de Lôffer après la coloration à l'hématoxiline.

Il faut souligner que la diagnose du foie est rendue très difficile quand il n'y a que peu de foie sous la forme de purée de foie finement hachée. Aussi BREUSCH recommande-t-il de ne pas employer pour le résultat de la recherche, la phrase : « Il n'y a pas de foie dans le conglomérat », mais « le foie n'était pas décelable ».

Le foie, d'après ce même auteur, est diagnostiqué facilement lorsqu'il entre pour plus de 10 % dans la composition du produit. Il faut recommander au spécialiste qui s'efforce de reconnaître le foie, de commencer sa recherche avec un faible grossissement (60 diamètres par exemple). Par la suite, il pourra grossir 100 ou 120 fois et plus.

La mamelle au repos offre aussi des difficultés pour la diagnose. Nous conseillons de faire un pâté-type : mamelle, rate, muscle et graisse. On en fera des coupes qui serviront de références pour ces organes.

La mamelle en lactation est plus facile à reconnaître. Les gouttelettes de lait ont un aspect particulier.

La mamelle n'est pas admise dans les pâtés de l'armée. Aussi, la diagnose de ce tissu revêt-elle une importance toute particulière. Au surplus, les mamelles sont souvent lésées.

La *rate* est assez délicate à reconnaître en tant qu'organe, mais il est facile de voir qu'il s'agit de tissu lymphoïde. Si on aperçoit les travées fibreuses et la capsule, il y aura présomption. Si on voit les corpuscules de Malpighi, il y aura certitude.

Les différentes parties de l'appareil digestif sont, le plus souvent, bien reconnues.

Soit, comme exemple, le pâté n° 27 examiné le 20 mai 1948, au Laboratoire d'Hygiène des Denrées Alimentaires, par M. le Professeur LOMBARD.

Ce produit ,de couleur claire, dégageait une odeur spéciale, un peu fécaloïde, que celle du poivre ne pouvait masquer.

A l'examen microscopique, il est facile de déceler une importante quantité de gros intestin. Il apparaît aussi une certaine quantité de tissu adipeux. Peu de fibres musculaires striées. Du tissu conjonctif. Du tissu aréolaire.

Conclusion : pâté à prédominance intestinale.

Dans les pâtés d'abats, même stérilisés en boîte, comme l'était le n° 27, les villosités apparaissent très nettement lorsqu'il s'agit d'intestin grêle. Les différentes couches de l'intestin peuvent être identifiées. Les glandes de Lieberkühn restent intactes. Les parasites endocellulaires peuvent être reconnus. Des lésions d'entérite aiguë ou chronique sont décelables.

Toutes les muqueuses peuvent être conservées : langue, muqueuse buccale, vésicale, etc...

La peau et ses annexes sont facilement reconnues. La peau est très souvent rencontrée dans les pâtés de mauvaise qualité. Dans certains produits, elle constitue plus du tiers des tissus inclus.

Elle reste toujours intacte avec ses glandes, ses poils, ses poils tactiles à sinus sanguins (cf. observation n° 23).

Une fraude consiste à inclure dans les pâtés des *tissus fœtaux*. Il faut se reporter aux descriptions histologiques de ces tissus. D'après les auteurs allemands, les transformations des tissus fœtaux ne sont pas plus sensibles que celles des tissus adultes.

Produits végétaux :

Les condiments sont retrouvés sur les coupes, l'amidon aussi. Les cellules végétales, plus claires, plus grandes, à cause de leur membrane cellulosique, sont très bien conservées. Il n'est pas rare de reconnaître des cellules d'oignons ou des grains d'amidon.

L'inclusion frauduleuse de pomme de terre, de soja, de carrottes est décelée par ce moyen, avec la plus grande facilité. Pour rechercher ces fraudes, l'inclusion n'est pas nécessaire. Un simple examen après écrasement entre deux lames suffit.

Les truffes sont aussi reconnaissables. Il est même possible, d'après le Professeur DRIEUX, de diagnostiquer la variété et la qualité des truffes employées dans les pâtés truffés.

Des substances étrangères et des parasites peuvent être reconnus.

Des râclures de bois provenant sans doute des billots, des larves d'échinocoques, de cœnures, des cysticerques, des œufs de douve, des larves de trichine, des

strongles, des larves d'acariens ,de mouches, de coléoptères ont été trouvées. Les œufs de douve sont particulièrement visibles.

Par des colorations spéciales, sont mis en évidence les bactéries, tous les microbes, des champignons, en particulier les moisissures, des protozoaires. Aussi, juge-t-on de la propreté des manipulations et de la valeur des produits constituants.

PEUT-ON SAVOIR DE QUELLE ESPECE ANIMALE PROVIENNENT LES ORGANES EXAMINES

C'est là une question délicate. Si des poils sont inclus dans la préparation, ce diagnostic, quoique délicat, est possible. Des auteurs ont indiqué des moyens précis pour y parvenir. Si aucun poil n'est trouvé, si l'on ne trouve pas de foie de porc, le diagnostic est pratiquement impossible. Le diamètre des fibres musculaires ne donne pas des indications très précises. L'épaisseur du sarcoplasme, la répartition des noyaux, la dimension des globules rouges ne sont pas suffisants. La taille des fibres varie avec les différents muscles de l'animal et les globules rouges sont le plus souvent déformés.

L'histologiste ne trouve pas, sans les poils, d'arguments suffisants pour être catégorique.

PROPORTION DES DIFFERENTS ORGANES ENTRANT DANS LA COMPOSITION DU PATE

Cette question a fait couler beaucoup d'encre outre-Rhin.

HARTMAN estime que l'on ne peut pas préciser avec certitude la composition quantitative d'un pâté.

BODROSSY, au contraire, trouve la méthode infaillible.

L'examen histologique donne, sur la composition du produit, une idée très proche de la réalité.

Pour chiffrer son opinion, il faut examiner un grand nombre de préparations du même produit et faire un tableau comportant cinq colonnes verticales.

Dans la première : on inscrira le nom des organes rencontrés ;

Dans la seconde : « gros fragments » ;
Dans la troisième : « moyens » ;
Dans la quatrième : « petits ».

La cinquième sera réservée aux observations, par exemple : état pathologique ou fœtal du tissu.

A chaque fragment rencontré sous le microscope, on fera un trait dans la case correspondant à l'organe et à la grosseur du fragment. L'inconvénient, c'est que ce moyen est très long. Il faut examiner les plaques systématiquement sur toute leur surface et il faut examiner au moins 8 ou 10 plaques.

INCONVENIENTS DE LA METHODE

HULSONBECK estime que la méthode ne permet pas d'affirmer s'il y a fraude ou non. C'est une opinion outrancière. La précision des résultats exposés dément assez cette assertion.

Les difficultés de diagnose provenant des manipulations et de la cuisson n'ont rien d'insurmontable. Lorsque quelques examens ont été pratiqués, lorsque des pâtés-types fabriqués au laboratoire, ont été examinés minutieusement, le travail devient beaucoup plus facile.

L'ennui est qu'il n'est pratiquement pas possible de savoir de quelle espèce proviennent les tissus. Mais la sérologie le dira avec grande précision.

Il n'est pas possible non plus de doser exactement la proportion d'amidon. Mais c'est là une analyse chimique des plus simples.

De même, la proportion de graisse ne peut être établie du fait des nombreux solvants employés. Là aussi, l'analyse chimique fixera avec une grande précision.

Surtout, la proportion des différents organes et tissus ne peut être affirmée. Il n'en demeure pas moins admirable que l'on puisse avoir une idée sur cette question.

CONCLUSION

AVANTAGES DE LA METHODE

Rares sont en France les Laboratoires capables de pratiquer l'examen histologique requis.

Dans cette méthode, l'esprit d'observation est le principal instrument. Il est évidemment beaucoup plus facile de pratiquer des réactions chimiques. Certes, pour l'amidon, l'eau, les graisses, l'analyse chimique ne saurait être remplacée par la méthode histologique. Mais l'analyse chimique ne donne jamais en calories assimilées la valeur énergétique exacte d'un produit.

Le chimiste donne, à partir du résultat de l'analyse des lipides, des protéides et des glucides, la « valeur énergétique corrigée » en usant des coefficients tenant compte de l'énergie nécessaire à la digestion, à l'assi-

milation et au métabolisme. Les résultats sont même donnés avec une décimale !

Mais il ne tient aucun compte de la digestibilité variable des différents tissus. Les protéides du tendon sont additionnées avec celles du cartilage, les glucides du foie avec ceux du poumon et de l'amidon.

Or, le tendon, à valeur de protéide égale, ne fournira pas à l'organisme la même quantité de calories que le muscle. Si, pendant 15 jours, on nourrit deux chiens : l'un avec du muscle, l'autre avec du tendon, chacun recevant la même « ration » calorifique, le premier se maintiendra, tandis que le deuxième maigrira.

Preuve que la valeur des aliments, au point de vue énergétique, ne doit pas être entendue ainsi.

Il faudrait expérimentalement savoir, en fonction de leur assimilitation, la valeur énergétique exacte des différents tissus et organes, puis calculer la valeur énergétique du pâté en multipliant celle-là par le poids de chaque constituant du produit. On y ajouterait la valeur énergétique de l'amidon et des graisses, déterminée en se servant de la méthode actuellement employée. Ainsi l'analyse histologique passera au premier plan de l'Hygiène des Denrées Manipulées et les rations pourront être calculées avec une précision jusqu'ici jamais atteinte.

L'armée, dans ses marchés, stipule que le poumon, la mamelle, la rate, ne doivent pas entrer dans la com-

position des pâtés destinés à la troupe. La méthode histologique seule permet de faire respecter cette clause.

Seule, cette méthode permet de préciser au surplus si les organes ou tissus employés sont atteints de lésions. On ne saurait donc trop souligner l'importance de cet examen.

Même sous forme de pâté, le poumon tuberculeux ou enflammé n'est pas salubre. Même bien stérilisées, certaines lésions microbiennes sont encore dangereuses, puisque certaines toxines résistent fort bien à la chaleur jusqu'à 180° et plus.

Par ailleurs, cet examen décèle les parasites contenus dans les produits employés et y révèle l'inclusion du tissu fœtal.

En associant l'examen histologique aux analyses bactériologiques, sérologiques et chimiques, l'hygiéniste arrivera à savoir, aussi bien que le fabricant, la composition d'un pâté.

Cette méthode simple, relativement rapide et précise, doit donc être généralisée dans l'intérêt de l'hygiène publique.

A l'examen organoleptique et macroscopique, doit se substituer l'analyse microscopique. Il serait inadmissible que l'empirisme persistât dans une science aussi moderne que l'Hygiène des Denrées Alimentaires.

Diagnostiquer les éléments constituants d'un pâté :

— C'est pouvoir donner une preuve tangible de ce que l'examen organoleptique permettait seulement de soupçonner.

— C'est pouvoir dire avec grande précision la valeur d'une marchandise, ce que la chimie ne peut pas exprimer.

— C'est pouvoir argumenter avec précision devant un Tribunal.

Vu :
Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire rapporteur,
Ch. LOMBARD.

Vu :
Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire,
PONS.

Vu :
Le Président de Thèse,
ANDRIEU.

Vu :
Le Doyen,
CALVET.

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse, le 16 Juin 1948

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université :

Pour le Recteur
le Doyen délégué,
CALVET.

BIBLIOGRAPHIE

J. Poisson. — Recherches sur la composition anatomique des produits manipulés de la charcuterie. Technique histologique. (*Le contrôle des viandes, du lait et autres produits alimentaires d'origine animale,* mars 1943).

H. Drieux. — L'examen histologique des produits manipulés de la charcuterie (*Encyclopédie vétérinaire,* Tome II - 1945-1946, page 145).

E. Pérard. — Contribution à l'étude de la charcuterie de disette - Les pâtés - *Thèse vétérinaire,* Alfort, 1944.

M. Piettre. — Inspection des viandes et des aliments d'origine carnée (1922), Librairie J.-B. Baillère et Fils, Tome II, pp. 351 et 361.

Brillat-Savarin. — Physiologie du goût, 1847, Charpentier, Libraire, Editeur.

M. LANGERON. — Précis de Microscopie, Masson et Compagnie.

Circulaire de l'armée N° 391, 2/5, du 17 janvier 1941.

Circulaire de l'armée, B. O. P. P., premier trimestre 1941, page 69.

Roger PURET. — La législation concernant les abattoirs publics et les tueries particulières. Les bases légales de l'inspection des viandes, des produits de charcuterie et des coquillages, *Thèse vétérinaire* Lyon, 1938.

GLAMSER. — Ein Beitrag zur mikroskopischen Untersuchung von Wurstwaren mit der gelatine-einbettungs - Gefrierschmitt - Methode. (*Zeitschrift für Fleisch - und Milchhygiene*, 15 juin 1926 - Année 1925-1926, p. 287).

K. BELLER. — Zur Technik der Wurstunterssuchung *Zeitschrift für Fleisch - und Milchhigiene* 1er janvier 1941, 1940-1941, p. 85.

F. SCHONBERG. — Uber Gütefragen bei Würstwaren. *Zeitschrift für Fleisch - und Milchhygiene* - 15 février 1941, 1940-1941, p. 125.

E. BREUSCH. — Schnelleinbettung von Würsten und Fleischgemengen zur histologischen Untersuchung. - *Zeitschrift für Fleisch - und Milch hygiene* 15 juillet 1930 - 1929-1930, p. 429.

F. SCHONBERG. — Zur Beurteilung von Fleisch - und Wurstwaren im Kriege - *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 5 avril 1940, 1940, page 157.

Otto NEUMULLER. — Ueber die Technik und die zweckmaszige Fassung des Urteils bei der histologischen Wurstuntersuchung - *Berliner und Müncher Tierärztliche Wochenschrift* - 21 juin 1940, 1940, page 289.

F. SCHONBERG. — Zur Ausführung und - Zuverlässigkeit der histologischen Wurstuntersuchung (16 photographie). - *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* - 18 octobre 1940 - 1940, page 501.

BLANCHARD et PANTALÉON. — Essais de détermination quantitative de la teneur en foie des préparations de charcuterie par le dosage de l'acide cholalique (*Le contrôle des viandes et du lait et autres produits alimentaires d'origine animale* - mai 1943)

SCHONBERG. — Leberwurst musz Leber enthalten Rechtsprechung und Rechtsfragen) - *Zeitschrift für Fleisch - und Milchhygiene* - 15 juin 1940 - 1939-1940, p. 301.

H. ROHRER. — Erfahrungen mit der histologischen Wurstuntersuchung. - *Zeitschrift für Fleisch - und Milchhygiene* - 15 janvier 1940 - 1939-1940, page 83.